第2卷第4期增刊　　动 物 学 研 究　　Vol.2, No. 4
1981年11月　　ZOOLOGICAL RESEARCH　　Nov., 1981

银环蛇(*Bungarus multicinctus*)毒柱层析分离及其组份的活性测定和α-银环蛇毒素的纯化

龚潮梁　孙　欣　何其伟
(中国科学院昆明动物研究所)

薛涛云　李淑颜　赵延德
(广州医学院药理学教研室)

摘　要

本文报导了用CM-Sephadex C-50分离广东产银环蛇毒，得到十三个蛋白组份。测定了九种酶在这些组份中的分布、五个主要毒性组份的神经肌肉阻断作用和小鼠的LD_{50}。小鸡颈二腹肌神经肌肉阻断作用试验表明组分3及组分6显示突触后膜阻断作用，组份9、组份10及组份11为突触前膜阻断作用。对主要的突触后膜毒素组份3进一步用凝胶过滤和离子交换层析进行纯化，得到聚丙烯酰胺凝胶电泳纯一的α-银环蛇毒素。

Chang和Lee[1]用淀粉凝胶电泳分离银环蛇毒得四个组份：一个突触后神经肌肉阻断成份（α-bungarotoxin）、二个突触前神经肌肉阻断成份β-bungarotoxin和γ-bungarotoxin）和一个非毒性组份，这是首次得到了这两种不同类型的银环蛇神经毒素。其后，Lee等[2]、Mebs等[3]和Dryden等[4]用分离效果更好的离子交换柱层析分离银环蛇毒，得到8～13个组份，其中属于α-型和β-型毒素的组份都有好几个。由于α-银环蛇毒素和β-银环蛇毒素有其独特的作用，国内许多单位对它们的需要日益迫切，我们开展了银环蛇毒的柱层析分离及其组份的研究。本文着重报道银环蛇毒的柱层析分离、主要分离组份的活性测定和α-银环蛇毒素的纯化，而β-银环蛇毒素的纯化及其一些性质的测定将在以后另文报道。

材料和方法

1.银环蛇毒　由广州医学院药理教研室采集，取自广东省汕头地区养蛇场的鲜毒经真空干燥制成干粉。

2.CM-Sephadex C-50、Sephadex G-10、Sephadex G-50和Sephadex G-75均为瑞典Pharmacia厂的产品。

3.银环蛇毒的柱层析分离　400mg银环蛇毒溶于1ml pH5.0，0.05*M*，醋酸铵缓冲液中，加入用同一缓冲液平衡的CM-Sehadex C-50柱（1.5×42cm）中，用平衡缓冲液洗涤后，再用三个直线盐浓度梯度进行洗脱：（1）400ml pH5.0，0.05*M*醋酸铵缓冲液—400ml pH6.8，0.5*M*醋酸铵缓冲液；（2）300ml pH6.8，0.5*M*醋酸铵缓冲液—300ml pH7.0，0.7*M*醋酸铵缓冲液；（3）300ml pH7.0，0.7*M*醋酸铵缓冲液—300ml pH7.0，1*M*醋酸铵缓冲液。分部收集洗脱液，每管收集6ml，20分钟收集一管。洗脱液中的蛋白组份检测是采用测定溶液的280nm光吸收。

4.凝胶过滤和*CM-Sephadex C-50*重层析　参照银环蛇毒柱层析分离的条件进行。

5.酶活力测定　按涂光俦等[5]发表的方法进行。

6.小鸡颈二腹肌神经肌肉阻断试验　参照Ginsborg和Warriner[6]的方法进行。出壳7～14天的小鸡剪开颈部皮肤，剥离一侧颈二腹肌，使神经部分长度剥离出1cm左右。剪下此神经肌肉标本浸在Krebs-Henseleit溶液中，通以氧气并维持32°C。用波宽为0.5ms的超强方波刺激神经，每5秒钟刺激一次。肌肉收缩用等张杠杆描记于烟鼓上。用浓度为4μg/ml的溴化乙酰胆硷引起的肌肉收缩，待杠杆上升到最高点时换用Krebs-Henseleit溶液洗去乙酰胆硷，使肌肉恢复正常。用分离纯化的组分作用于标本时，毒素浓度为2μg/ml，待完全阻断后再加乙酰胆硷，观察肌肉是否能再现收缩。以此鉴别β-型毒素与α-型毒素。

7.LD_{50}　按张昌绍、张毅主编的药理学一书[7]所介绍的改进的Kärber法进行测定。每个样品采用4～5个剂量组，每组用18～20g的小鼠10只，雌雄均可。根据24小时的死亡率进行计算LD_{50}。

8.聚丙烯酰胺凝胶电泳　采用垂直平板式凝胶电泳，凝胶板大小为12×8×0.2cm，浓缩胶浓度为4％，pH4.3，分离胶浓度为10％或15％，pH6.7，这二种胶的交联度均为2.6％。电极缓冲液为pH4.5，β-丙氨酸—醋酸缓冲液。电泳时电流恒定为15mA，电泳3小时。电泳后用50％三氯醋酸固定区带后用考马斯亮兰R_{250}染色。

结　果

1.银环蛇毒用CM-Sephadex C-50柱层析分离后，所得的层析图谱如图1。

分离得到13个组份，其中组份1为不吸附峰，毒性很低。各组份的蛋白总回收率（按280nm的OD数计算）达到85％以上。各组份合并后直接冻干，得到含盐的干粉。

2.对13个组分进行了九种酶的活力测定，寻找各酶的主要分布区域，测定结果如表1所示：

3.对13个组份中含量较高的毒性组份3、6、9、10及11五个组份进一步纯化。先用凝胶过滤层析进行纯化，这些组份含盐的冻干粉溶于少量水中，组份3及6分别用Sephadex G-50柱（1.6×120cm）进行分离，组份9、10、11分别用Sephadex G-75柱（1.6×120cm）进行分离，洗脱液均用pH5.0，0.5*M*醋酸铵缓冲液。各组份的分离图形如图2所示：

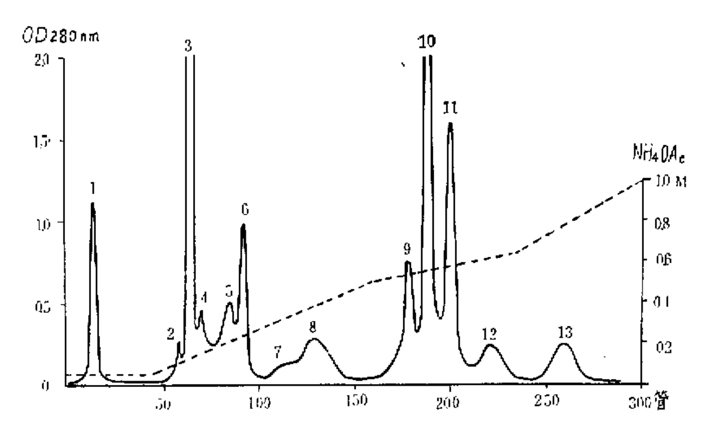


图 1　银环蛇毒的CM-Sephadex C-50柱层析分离图谱

银环蛇毒400mg。CM-Sehpadex C-50柱(1.5×42cm) 用pH5.0，0.01M醋酸铵缓冲液平衡。梯度洗脱，每小时收集 3 管，每管 6 ml

表 1　　银环蛇毒分离组分中九种酶活性的分布

酶	活力分布区域	活力高峰区
L-氨基酸氧化酶	组份 1	
蛋白水解酶	组份 1	
磷酸单酯酶	组份 5、6、7、8、9	组份 8、9
磷酸二酯酶	组份 5、6、7	组份 5、6
磷酯酶 A	组份 3、4、5	组份 3
胆硷酯酶	组份 3、4、5、6	组份 5
5'核苷酸酶	组份 5、6、7、8	组份 9
NAD酶	组份 5、6、7、8	组份 9
精氨酸酯酶	各组份活力均很低	

组份 3、10和11凝胶过滤层析的主峰合并后冻干，经用Sephadex G-10柱(2.0×95 cm) 脱盐，溶液再冻干后分别溶于 pH5.0，0.05M醋酸铵缓冲液，再用 CM-Sephadex C-50柱 (1.5×40cm) 分别重层析，梯度洗脱，层析图谱如图 3 所示。

重层析后合并其主要组份，经冻干和用Sephadex G-10柱层析脱盐后，最后再冻干成干粉。我们把经过以上这样提纯的组分称为提纯的组份3、提纯的组份10和提纯的组份11。

4.用小鸡颈二腹肌标本测定组分 3、6、9、10、11这五个组份的神经肌肉阻断作用，实验结果表明组份 3 和组份 6 完全阻断神经传导后，加入乙酰胆硷未见引起肌肉收缩，这表明它们是突触后阻断作用的α-型毒素。组份 9、10和11 在完全阻断神经传导后，加入乙酰胆硷都引起肌肉收缩，这表明它们是突触前阻断作用的β-型毒素。图 4 为提纯的组份 3、6、9、10和11的小鸡颈二腹肌神经肌肉阻断作用描记图。

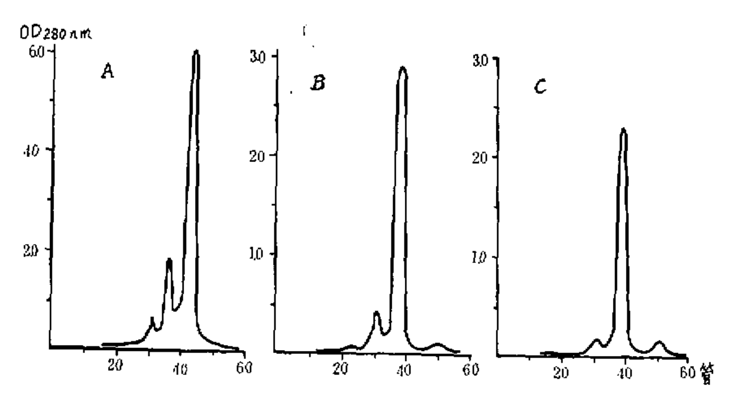


图 2 银环蛇毒几个主要组分的凝胶过滤图

A：组份3含盐干粉143mg，Sephadex G-50柱(1.6×120cm)，每小时收集3管，每管4.4ml

B：组份10含盐干粉160mg，Sephadex G-75柱(1.6×120cm)，每小时收集3管，每管4ml

C：组份11含盐干粉115mg，Sephadex G-75柱(1.6×120cm)，每小时收集3管，每管4ml

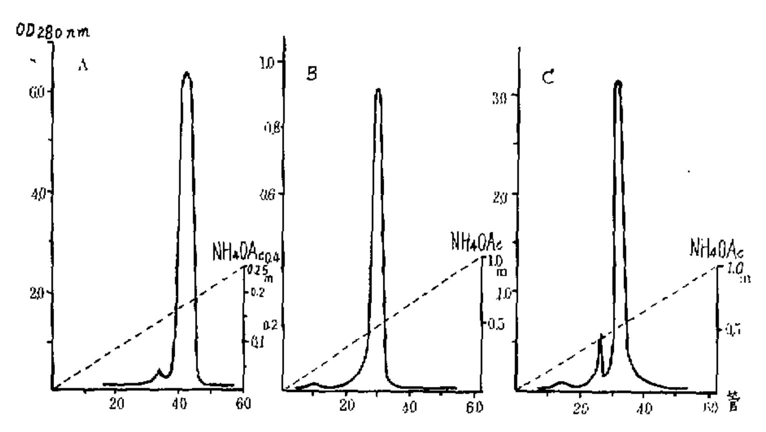


图 3 银环蛇毒的三个组份在CM-Sephadex C-50柱上的重层析图

CM-Sephadex C-50柱大小为1.5×40cm，醋酸铵缓冲液梯度洗脱，每小时收4管，每管4ml

A：组份3经Sephadex G-50凝胶过滤后的主峰干粉150mg

B：组份10经Sephadex G-75凝胶过滤后的主峰干粉17mg

C：组份11经Sephadex G-75凝胶过滤后的主峰干粉50mg

这五个纯化组份的毒性大小和神经肌肉阻断的情况，概要地用表2说明。

5.提纯的组份3经上述九种酶活性测定，都未测到明显的酶活性，用聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定纯度，明示单一的区带，说明提纯的组份3达到了电泳纯。免疫扩散试验，组份3也只出现单一的抗原抗体复合物沉淀线。图5为提纯的组份3的聚丙烯酰胺电泳照片，图6为提纯的组份3的免疫投散的照片。

表2　提纯的组份3、6、9、10和11的毒性和神经肌肉阻断作用

组　份	小鼠LD_{50} (腹腔注射) (μg/g)	小鸡颈二腹肌神经肌肉完全阻断的时间 (分) (毒素浓度：2μg/ml)	完全阻断后肌肉对乙酰胆碱(4μg/ml)的反应	毒　素　类　型
组份 3	0.11±0.02	10	不引起收缩	α
组份 6	0.48±0.05	24	不引起收缩	α
组份 9	1.04±0.10	22	引起收缩	β
组份 10	0.094±0.002	33	引起收缩	β
组份 11	0.0078±0.0002	28	引起收缩	β

* 组份3、10和11是经凝胶过滤和离子交换重层析提纯的，组份6和9是经过凝胶过滤提纯，而未经过离子交换重层析提纯的。

根据以上各种实验结果，不难看出，我们提纯的组份3就是Lee等人[2]、Mebs等人[3]和Clark等人[8]所提纯的α-银环蛇毒素（α-bungarotoxin）。

银环蛇毒中主要的β-型毒素—组份10和11，虽经我们用二次离子交换层析和凝胶过滤提纯，但在聚丙烯酰胺凝胶电泳时为二条和二条以上区带，对这个纯化组份的组成、纯度和活性有待进一步研究。

讨　论

银环蛇毒的组份十分复杂，据Altman和Dittmer[9]的资料记载，含有18种酶和多种突触前和突触后神经毒素，是一种重要的动物资源。从中提纯的α-银环蛇毒素和β-银环蛇毒素在神经生理学、生物化学和药物学（包括抗蛇毒血清）的研究上都非常重要的用途[10]。特别是α-银环蛇毒素与烟碱样乙酰胆碱受体的结合特别紧密，已经成为乙酰胆碱受体研究的不可缺少的重要工具[11]。由于银环蛇的排毒量很小，根据广西医学院的资料[12]每条银蛇一次排毒量平均为4.6mg，而实际从养蛇场取毒往往还取不到此数量。因此银环蛇毒的来源比较困难，蛇毒价格也较高，提纯的α-银环蛇毒素和β-银环蛇毒素在国际市场上更是昂贵。银环蛇除在缅甸和印度支那有所布分外，主要生产在我国的南方诸省（包括台湾省）。积极开发和利用银环蛇这一动物资源，除搞好用幼蛇制取金钱白花蛇供药用外，更应组织对其蛇毒的研究和利用，生产α-银环蛇毒素和β-银环蛇毒素之类重要产品供应国内外需要，便可充分利用资源，创造财富。本文报导的内容为此提供了依据和方法。

我们采用的CM-Sephadex C-50柱层析分离银环蛇毒的条件与Lee、Mebs、Drydern等[2－4]有所不同，在低盐浓度洗脱部份的分离效果比他们的好些，即α-型毒素所在部份分出的峰数较多些。我们的分离图谱中α-银环蛇毒素（即组份3）和主要的β-毒素（即组份10、11和9）的洗脱位置和峰形都很接近国外诸家的图形。

Ginsborg和Warriner[6]建立的用小鸡颈二腹肌神经肌肉标本进行的神经肌肉阻断试验，是鉴别神经毒素及其作用部位的重要方法，且比较灵敏。我们用此方法测定分离

组份的阻断特性，其结果与Lee等人的报导很接近。虽然我们用经典的等张槓杆描记于烟鼓，在许多次实验中终于获得较好的图形。α-型毒素是由于它与突触后膜乙酰胆碱受体的紧密结合，阻止了受体与乙酰胆碱的结合，从而造成了一种抗去极化型神经肌肉阻断作用，这种α-型毒素并不影响乙酰胆碱的合成与释放。因此，在α-型毒素产生的神经肌肉阻断后，外加乙酰胆碱也不能引起肌肉收缩。β-型毒素却不与突触后膜乙酰胆碱受体结合，而是抑制突触前的乙酰胆碱的合成与释放，造成乙酰胆碱的耗竭，从而阻断神经传导。此时，若加入外源性乙酰胆碱即可引起肌肉收缩。我们从小鸡颈二腹肌阻断试验中可以清楚地区分这二种类型的毒素。

对13个分离组份的酶活力分布测定，其结果与Lee等人[2]的结果一致。值得注意的是磷酯酶A的分布，从我们的实验看出银环蛇毒的磷酯酶A分布在α-型毒素所在的位置，集中在α-银环蛇毒素所在的组份3上，此酶活性可在凝胶过滤和CM-Sephadex C-50重层析中完全除去，提纯的组份3（α-银环蛇毒素）用间接溶血法测定不到磷酯酶的活性。β-型毒素所在的组份和经过凝胶过滤和CM-Sphadex C-50重层析提纯的组份10和11，我们均未测到明显的磷酯酶A的活性，此结果与Lee等人[2]、Sen等人[13]、Renald和Howard（1977）的实验结果相一致，但Werchicke等人[14]、Strong等人[15]和Tobias[16]等人却报告β-银环蛇毒素具有磷酯酶A的活性。究竟真相如何，尚待进一步研究，我们准备在下一步就β-银环蛇毒素的毒性与磷酯酶A的活性等方面进行研究与探讨。

用本文报道的方法提纯的α-银环蛇毒素，其毒性和神经肌肉阻断时间都和文献报道的数值相近，且无九种酶的活性，聚丙烯酰胺凝胶电泳呈现单一区带，说明我们提纯的α-银环蛇毒素已达到生理、生化和药物学研究要求的纯度标准。

参 考 文 献

[1] Chang, C.C. & Lee, C.Y. Isolation of neurotoxins from the venom of *Bungarus multicinctus* and their mode of neuromuscular blocking action. *Arch. int. pharmacodyn.* 1963, 144, 241.

[2] Lee, C.Y. et al. Chromatographic separation of the venom of *Bungarus multincius* and characterization of its components. *Chromatography,* 1972, 72, 71.

[3] Mebs, D. et al. purification, properties and amino acid sequence of β-bungarotoxin from the venom of *Bungarus multicinctus. Hope Seylers Z. Physiol. Chem.* 1972, 353, 243.

[4] Dryden, W.F. et al. Pharmacological studies on the bungarotoxin. Separation of the fractions and their neuromuscular activities. *Europ. J. Pharmacol.,* 1974, 26, 256.

[5] 涂光俦等：我国几种常见毒蛇的蛇毒酶活力测定。生物化学与生物物理学报，1976，8 151.

[6] Ginsborg, B.L. & Warriner, J. The isolated chick biventer cervicis neuromuscle preparation. *Brit. J. Pharmacol.,* 1960, 15, 410.

[7] 张昌绍、张毅主编：药理学，1965，1，329. 人民卫生出版社.

[8] Clark, D.G. et al. Purification, characterization, and immunochemical studies of α-bungarotoxin. *Biochemistry,* 1972, 11, 1663.

[9] Altman, P.L. & Dittmer, D *Biology data book,* Second Edition, 1973, 3. 711, By Federation of American Societies for Experimental Biology.

[10] 朱培闳：银环蛇神经毒素的作用原理及其在神经科学中的应用．第一次蛇毒研究与利用讨论会资料（昆

明）, 1978.

〔11〕 陈式穆：α-银环蛇毒与烟碱样乙酰胆碱受体的研究。生理科学进展，1980, 11（4）, 296.

〔12〕 广西医学院：治疗蛇伤及蛇毒研究资料汇编。1966, 文 6.

〔13〕 Sen, I. et al., Mechanism of action of β-bungarotoxin on synaptosomal preparations. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 1976. 73, 2664.

〔14〕 Werricke, J. et al., The mechanism of action of β-bungarotoxin. J. Neurochem., 1975, 25. 483.

〔15〕 Strong, P.N. et al., β-Bungarotoxin, a presynaptic toxin With enzymatic activity. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1976, 73, 178.

〔16〕 Tobias, G.S. et al., β-Bungarotoxin: Relationship of phospholipase activity to toxicity. *Fed. Proc.* 1976, 35, 800.

CHROMATOGRAPHIC FRACTIONATION OF *BUNGARUS MULTICINCTUS* VENOM, ACTIVITIES DETERMINATION OF SOME FRACTIONS AND PURIFICATION OF α-BUNGAROTOXIN

Gong Chao-liag　　Sun Xin　　He Qi-wei
(Kunming Institute of Zoology, Academia Sinica)

Xue Tao-yan　　Li Shu-yan　　Zhao Yan-de
(Department of pharmacology, Guangzhou Medical College)

Abstract

It is reported in this paper that the *Bungarus multicinctus* venom from Guangdong Province has been fractionated on CM-Sephadex C-50 into thirteen fractions. Distribution of nine enzymes are determined in the thirteen fractions and neuromuscular blocking action and LD_{50} of mice (ip) are assayed in five main toxic fractions. Experiment on the neuromuscular blocking action of chick biventer cervicis muscle showed that fraction 3 and 6 exhibited the property of postsynaptic neurotoxin (α-type), fraction 9, 10 and 11 contained presynaptic neurotoxin (β-type), as judged from the acetylcholine response of the chick muscle after neuromuscular blockade. Further purification of the fraction 3 by gel filtration on Sephadex G-50 and rechromatography on CM-Sephadex C-50, purified α-bungarotoxin is obtained. It showed a single band on polyacrylamide gel electrophoresis at pH 4.5.